

使用反相色谱法分析药用肥皂中的有效组分异丙基甲基苯酚

岩田奈津纪

对用户的好处

- ◆ 使用反相色谱法可以分离异丙基甲基苯酚 (IPMP) 和对羟基苯甲酸丁酯 (分离度为 2 以上)
- ◆ 厚生劳动省限制的 IPMP 添加量 (0.1~0.5%) 可由荧光和紫外可见检测器检出
- ◆ 高速分析可削减约 50% 的分析时间、约 40% 的流动相消耗量

■ 前言

2015 年, 欧洲化学品管理局 (ECHA) 停止销售含有三氯生的抗菌肥皂¹⁾, 2017 年, 美国食品药品监督管理局 (FDA) 停止销售含有三氯生等 19 种组分的抗菌肥皂²⁾。日本厚生劳动省 (MHLW) 也追随这一措施, 发出通知要求更换为替代产品³⁾。而替代产品所采用的具有代表性的组分即为异丙基甲基苯酚 (IPMP)。

参考香料与化妆品测试标准, 含有对羟基苯甲酸酯 (羟苯丁酯) 作为防腐剂的产品, 使用反相色谱法 (反相模式) 可能出现 IPMP 与对羟基苯甲酸丁酯的色谱峰重叠的情况, 推荐采用正相色谱法 (正相模式)⁴⁾。但是, 正相模式与反相模式相比不易使用。

本文使用 Shim-pack™ GIST C18, 在反相模式下分离这些组分能够达到 2 及以上的分度度。同时, 通过荧光检测器可实现比 UV 检测器高约 20 倍的高灵敏度。此外, 通过使用粒径 2 μm 的高效分析色谱柱, 实现与粒径 5 μm 的色谱柱相比分析时间减少约 50%, 流动相消耗量减少约 40%。

■ 异丙基甲基苯酚标准溶液的分析

IPMP 是一种具有杀菌、抗菌、抗氧化作用的组分, 现今为多数医药部外品和化妆品等产品使用, 是药用肥皂的有效组分。MHLW 限制其添加量为 0.1~0.5%⁵⁾, 分析时采用荧光检测器。药用肥皂不在香料与化妆品测试方法范围之内, 但是参考 MHLW 测试方法, 其中指定了荧光检出条件。方法中同时指出 IPMP 添加量为 0.25% 以上的浓度时, 可以使用紫外 - 可见 (UV) 检测器。

本文参考香料与化妆品测试法探讨 IPMP 分析⁴⁾ 及其高效化。分析条件如表 1、2 所示。使用荧光检测器 (RF-20AXS) 及发光二极管阵列 (PDA) 检测器 (SPD-M40) 采集的色谱图如图 1 所示。两图均为上图是使用粒径 5 μm 的分析色谱柱、Shim-pack GIST C18 采集的色谱图, 下图是使用同系列高效分析色谱柱 (粒径 2 μm) 采集的色谱图。通过使用高效分析色谱柱, 实现分析时间减少约 50%, 流动相消耗量减少约 40%。

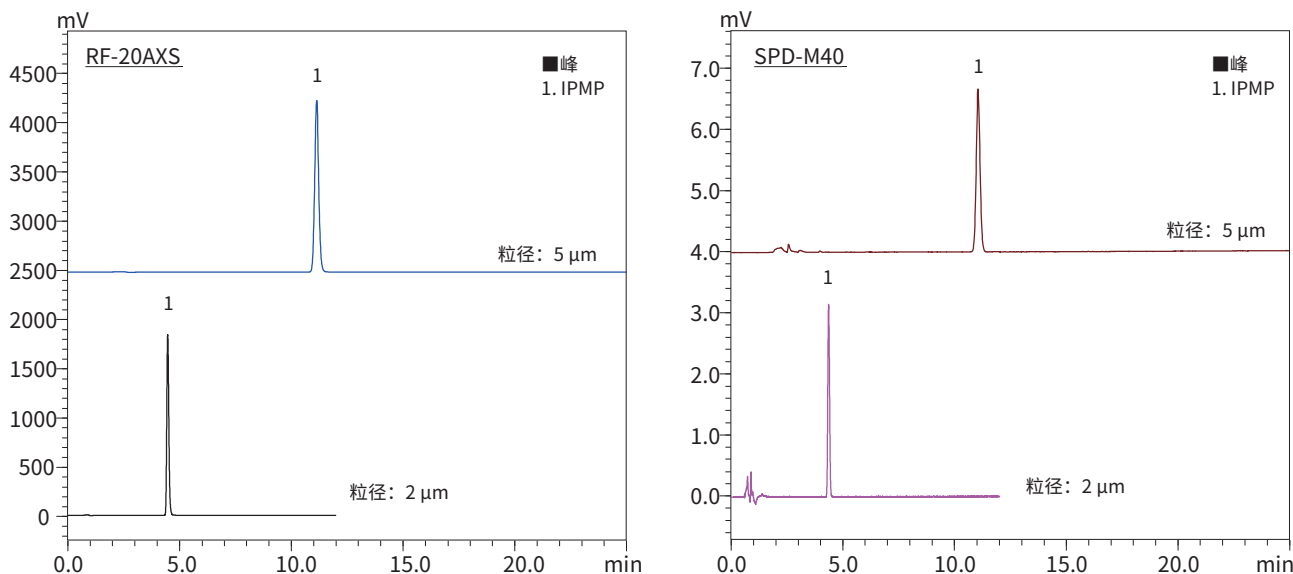


图 1 IPMP 标准溶液 (5 mg/L) 的色谱图

表 1 分析条件 (粒径 5 μ m)

系统	: Nexera lite
柱	: Shim-pack GIST C18 * ¹ (250 × 4.6 mm I.D., 5 μ m)
流速	: 1.0 mL/min
流动相	: A) 水 B) 乙腈 B. 浓度 50%
柱温	: 40 °C
进样量	: 10 μ L
瓶	: SHIMADZU LabTotal™, 用于 LC 1.5 mL, 玻璃材质 * ²
检测 (PDA)	: SPD-M40, 278 nm
检测 (FL)	: RF-20AXS Em: 280 nm, Ex: 305 nm

*1 P/N: 227-30017-08 *2 P/N: 227-34001-01

表 2 分析条件 (粒径 2 μ m)

系统	: Nexera XR
柱	: Shim-pack GIST C18 * ³ (150 × 3.0 mm I.D., 2 μ m)
流速	: 0.8 mL/min
流动相	: A) 水 B) 乙腈 B. 浓度 50%
柱温	: MR 180 μ L II
进样量	: 40 °C
瓶	: 4 μ L
检测 (PDA)	: SHIMADZU LabTotal™, 用于 LC 1.5 mL, 玻璃材质
检测 (FL)	: SPD-M40, 278 nm RF-20AXS Em: 280 nm, Ex: 305 nm

*3 P/N: 227-30002-05

异丙基甲基苯酚与羟苯丁酯的分离

参考香料与化妆品测试法, 含有对羟基苯甲酸酯 (羟苯丁酯) 作为防腐剂时, 使用反相模式可能出现两者分离不充分的情况, 推荐采用正相模式。但是, 众所周知, 正相模式与反相模式相比不易使用, 例如色谱柱平衡时间长, 基线不易稳定等。图 2 所示为使用 RF-20AXS 分析的 IPMP 与对羟基苯甲酸丁酯混合标准溶液色谱图。使用 Shim-pack GIST C18, 在反相模式下能够成功分离这两个组分, 分离度可以达到 2 甚至以上 (表 3)。

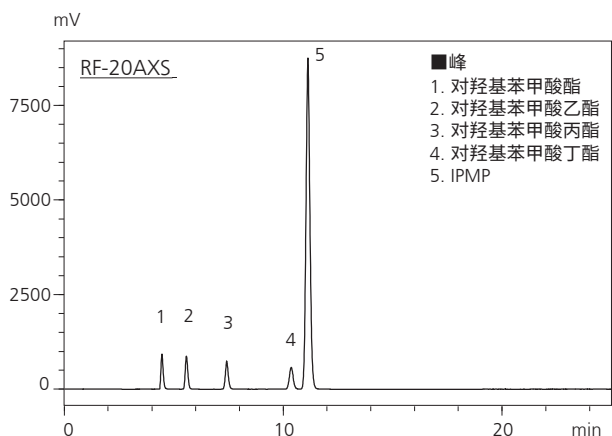


图 2 IPMP 与对羟基苯甲酸酯混合标准溶液 (25 mg/L) 的色谱图

表 3 IPMP 与羟苯丁酯的分离度

柱	检测器	分离度
Shim-pack GIST C18 (粒径: 5 μ m)	RF-20AXS	2.3
	SPD-M40	2.3
Shim-pack GIST C18 (粒径: 2 μ m)	RF-20AXS	2.0
	SPD-M40	2.2

标准曲线

各自分析条件下 0.5~10 mg/L 的标准曲线如图 3 所示。该浓度相当于实际试样中含量的 0.025~0.5%。两者均得到了相关系数 R²=0.9999 以上的良好线性。

Shim-pack GIST C18 (粒径 5 μ m) Shim-pack GIST C18 (粒径 2 μ m)

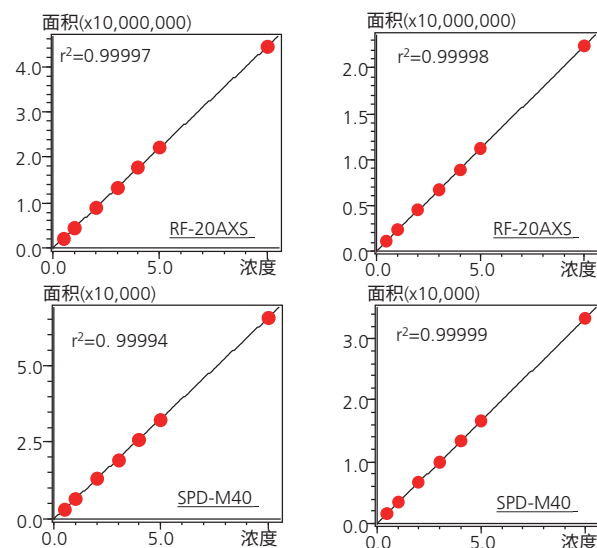


图 3 测量线

RF-20AXS 与 SPD-M40 的灵敏度比较

RF-20AXS 与 SPD-M40 检测器使用 ASTM 法计算出的 IPMP (2 mg/L) S/N 如表 4 所示。此外, 这些检测器获得的色谱图比较如图 4 所示。该浓度相当于实际试样中含量的 0.1%, 即 MHLW 允许的最低含量。RF-20AXS 的灵敏度高于 SPD-M40 约 20 倍。此外, 即使使用 SPD-M40 时, 方法的定量下限也低于 MHLW 允许加入的最低浓度。

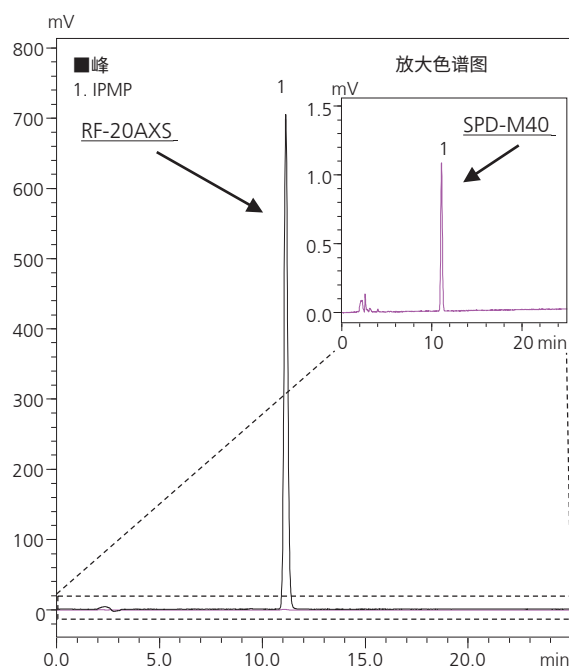


图 4 IPMP 标准溶液 (2 mg/L) 的色谱图比较

表 4 IPMP (2 mg/L) 的 S/N 比较

柱	检测器	S/N ^{*4}
Shim-pack GIST C18 (粒径: 5 μ m)	RF-20AXS	6289
	SPD-M40	317

*4 ASTM, 范围: 15-25 min, 间隔: 0.5 min

重现性

表 5 所示为 1 mg/L 标准溶液重复分析 6 次时的保持时间与面积的重现性 (% RSD)。所有分析的保持时间、面积结果的重现性均在 1% 下。此外, 能够以高灵敏度检出的 RF-20AXS 的面积重现性好于 SPD-M40。

表 5 重复分析6次时的重现性 (%RSD)

柱	检测器	保持时间	面积
Shim-pack GIST C18 (粒径: 5 μm)	RF-20AXS	0.04	0.13
	SPD-M40	0.04	0.79
Shim-pack GIST C18 (粒径: 2 μm)	RF-20AXS	0.12	0.17
	SPD-M40	0.13	0.49

药用肥皂中异丙基甲基苯酚的分析

试样采用 4 种市售药用肥皂。前处理方法参考香料与化妆品测试法。图 5 所示为前处理方案。通过甲醇溶剂提取药用肥皂, 使用 0.2 μm 的膜过滤器过滤后, 以甲醇稀释, 供 HPLC 分析。

图 6 所示为使用粒径 5 μm 色谱柱采集的色谱图, 图 7 所示为使用粒径 2 μm 色谱柱采集的色谱图。此外, 仅展示使用 RF-20AXS 的结果。所有分析当中 IPMP 均与其他组分成功分离。此外, 药用肥皂 C 中检出对羟基苯甲酸甲酯和对羟基苯甲酸乙酯。

根据定量结果计算出药用肥皂中的 IPMP 含量。药用肥皂中的 IPMP 含量如表 6、7 所示, 分别为使用 5 μm 和 2 μm 色谱柱测试结果。所有的分析测得的 0.1g/100g 或 0.1% IPMP 含量几乎相同, 在之前提到的不同方法和不同检测器之间不存在明显差异。

表 6 药用肥皂中的 IPMP 含量

表 6 药用肥皂中的IPMP含量
Shim-pack GIST C18 (粒径5μm)

	浓度		含量			
	mg/L		g/100 g		%*5	
	RF-20AXS	SPD-M40	RF-20AXS	SPD-M40	RF-20AXS	SPD-M40
药用肥皂 A	2.04	2.04	0.100	0.100	0.1	0.1
药用肥皂 B	2.08	2.08	0.102	0.102	0.1	0.1
药用肥皂 C	2.05	2.06	0.102	0.102	0.1	0.1
药用肥皂 D	2.06	2.05	0.101	0.101	0.1	0.1

*5日本MHLW的含量限制: 0.1~0.5%。

表 7 药用肥皂中的IPMP含量
Shim-pack GIST C18 (粒径2 μm)

	浓度		含量			
	mg/L		g/100 g		%	
	RF-20AXS	SPD-M40	RF-20AXS	SPD-M40	RF-20AXS	SPD-M40
药用肥皂 A	2.04	2.04	0.100	0.100	0.1	0.1
药用肥皂 B	2.09	2.08	0.103	0.102	0.1	0.1
药用肥皂 C	2.05	2.04	0.101	0.101	0.1	0.1
药用肥皂 D	2.05	2.05	0.100	0.100	0.1	0.1

称取1 g药用肥皂放入100 mL容量瓶中
加入70 mL甲醇, 然后超声处理
甲醇定容至100 mL
用0.2μm膜过滤 (丢弃初始滤液)
将5 mL样品溶液转移到25 mL容量瓶中, 加甲醇定容至25 mL, 并充分混合
HPLC

图 5 预处理方案

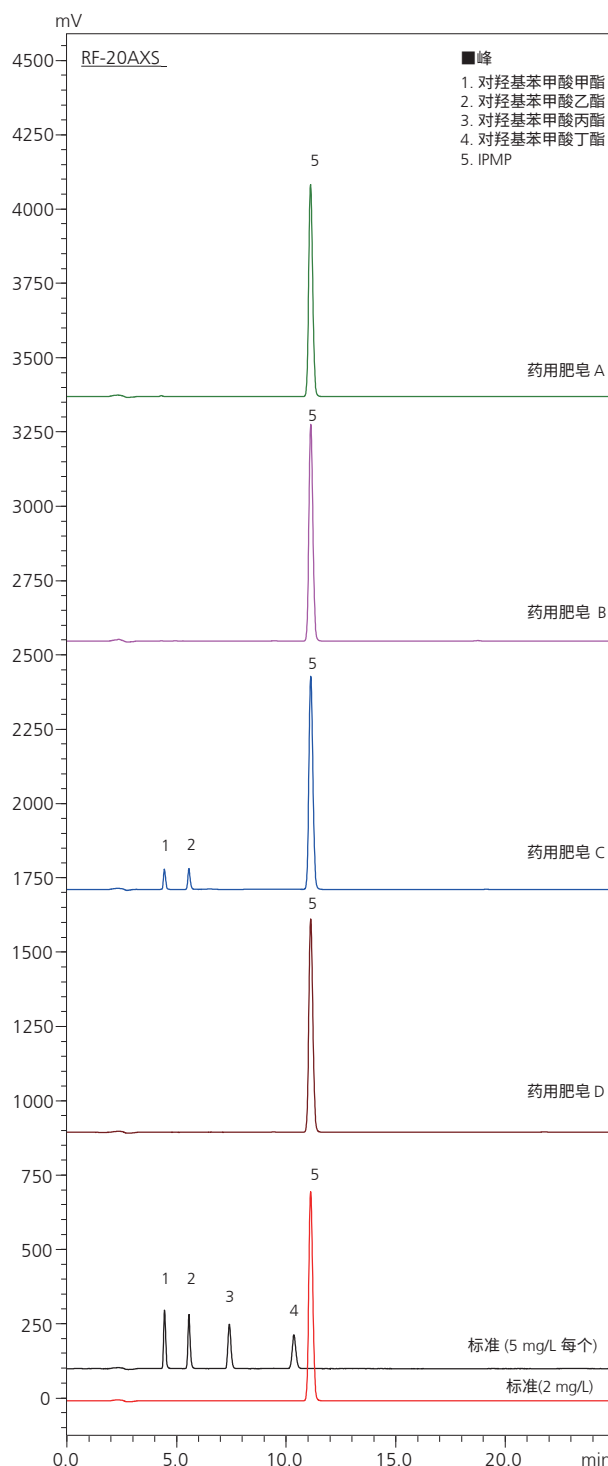


图 6 药用肥皂的色谱图 (粒径5μm色谱柱、RF-20AXS)

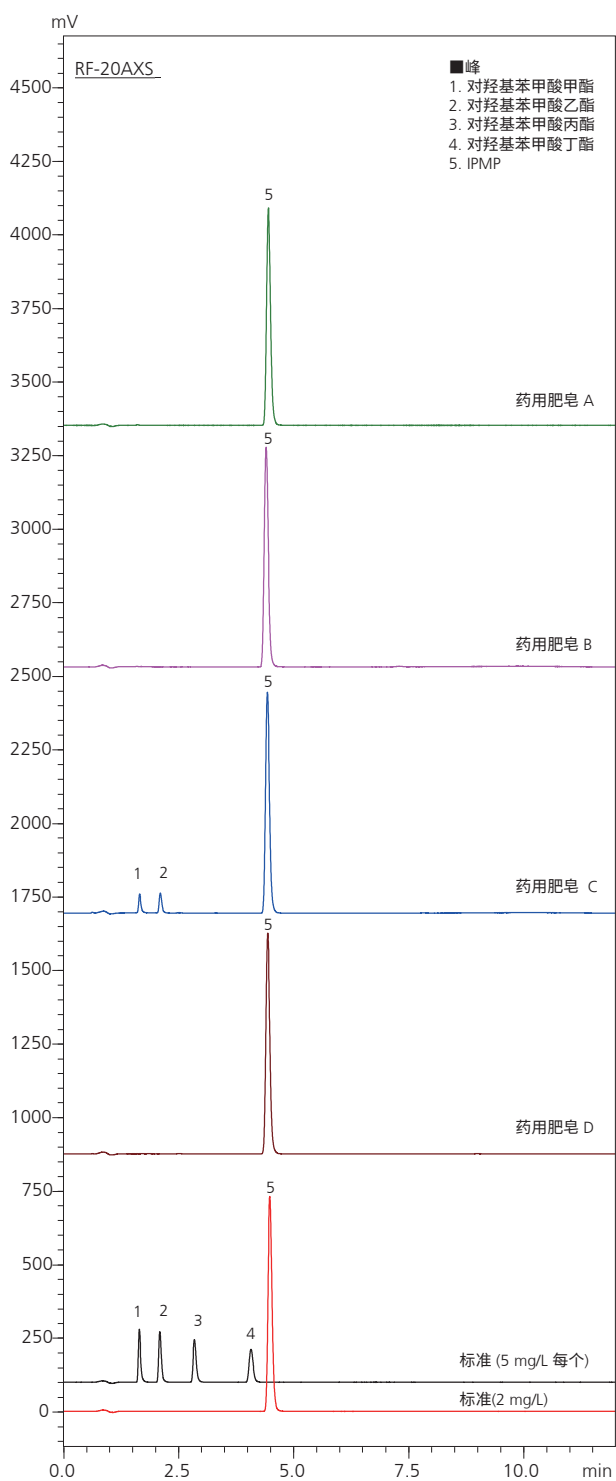


图 7 药用肥皂的色谱图 (粒径 2 μ m 色谱柱、RF-20AXS)

使用 UV 光谱确认

使用 SPD-M40 等 PDA 检测器时,除色谱峰的保持时间之外,还可根据色谱峰与标准品 UV 光谱的一致性进行鉴定。

使用 SPD-M40 分析的药用肥皂 A 与标准品的色谱图如图 8 所示。

Nexera、Shim-pack 和 SHIMADZU LabTotal 是岛津制作所株式会社在日本与其他国家的商标。

此外,图 8 中所得药用肥皂 A 中含有的保留时间 11 分钟左右的 UV 光谱与标准品 UV 光谱的重叠图如图 9 所示。对各 UV 光谱进行了标准化处理,以便进行比较。药用肥皂 A 及标准品均在 279 nm 检出极大吸收波长,因此可鉴定药用肥皂 A 的 11 分钟左右色峰为 IPMP。

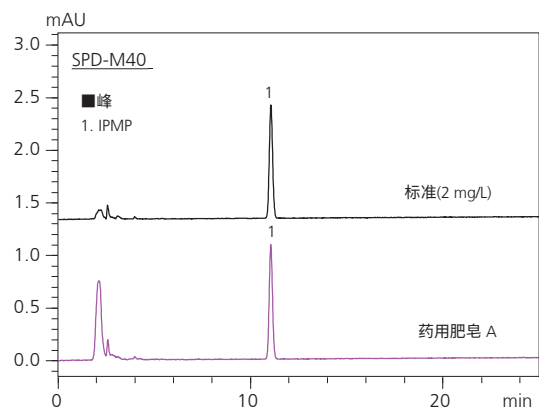


图 8 药用肥皂的色谱图 (SPD-M40)

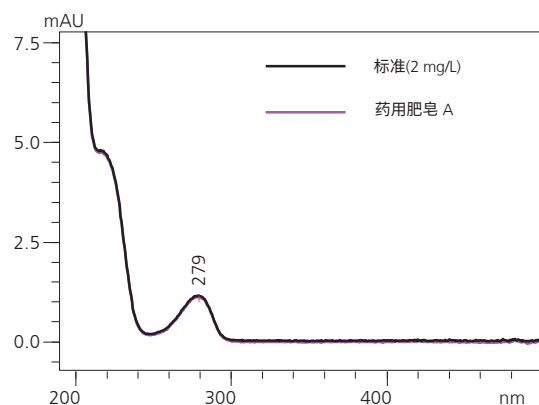


图 9 与 UV 光谱的比较 (SPD-M40)

结论

有关使用反相模式进行药用肥皂中 IPMP 分析,比较了两种检测方法,并且探讨了高效化分析。此次分析的试样中均不含有羟苯丁酯,因此使用混合标准溶液确认 IPMP 与羟苯丁酯的分离后发现,使用 Shim-pack GIST C18 可以达到 2 以上的分离度。此外,荧光检出器比 UV 检测器高约 20 倍的灵敏度。并且 UV 检测器也可定量分析添加量达到下限浓度 0.1% 的样品,以及可以根据 UV 光谱将 IPMP 与其他组分分离确认。因此,分析时可以使用 PDA 检测器提高鉴定精度,使用荧光检测器进行高灵敏度分析。并且通过使用同系列的高效分析色谱柱,在确保分离的情况下,实现分析时间及流动相消耗量分别减少约 50% 和约 40%。

<参考文献>

- 1) ECHA, Regulation (EU) No 528/2012 concerning the making available on the market and use of biocidal products (2015)
- 2) FDA, FDA issues final rule on safety and effectiveness of antibacterial soaps (2016)
- 3) 厚生劳动省有关药用肥皂的使用方法等 (2016 年 9 月 30 日药生药审发 0930 第 4 号及药生安发 0930 第 1 号)
- 4) 日本药学会编、卫生试验法・注解 2015、692-693、2015、金原出版
- 5) 厚生劳动省有关药用肥皂批准审查的注意事项 (2018 年 3 月 29 日药生药审发 0329 第 13 号)

岛津应用云



岛津企业管理(中国)有限公司
岛津(香港)有限公司

<http://www.shimadzu.com.cn>

用户服务热线电话: 800-810-0439
400-650-0439

免责声明:

* 本资料未经许可不得擅自修改、转载、销售;
* 本资料中的所有信息仅供参考,不予任何保证。
如有变动,恕不另行通知。